

December 20, 1994

PRODUCTION OF PLANT RESISTANT TO BLEACHING HERBICIDE

INVENTOR: YAMANO SHIGEYUKI ; MISAWA NORIHIKO

APPL-NO: 05163926

FILED-DATE: June 8, 1993

ASSIGNEE-AT-ISSUE: KIRIN BREWERY CO LTD

PUB-TYPE: December 20, 1994 - Un-examined patent application (A)

PUB-COUNTRY: JP

IPC-MAIN-CL: C12N01531

IPC ADDL CL: A01N06300 , A01H00100

ENGLISH-ABST:

PURPOSE: To impart a plant with resistance to a herbicide inhibiting zeta-carotene desaturase of a plant as well as to a herbicide inhibiting phytoene desaturase of a plant and to enable the use of these herbicides as a marker in transformation.

CONSTITUTION: A plant resistant to a herbicide for inhibiting zeta-carotene desaturase is produced by preparing a DNA sequence coding a polypeptide (phytoene desaturase) having an enzymatic activity to convert phytoene through zeta-carotene to lycopene and introducing the DNA sequence into a plant in a state to enable the manifestation of the genetic information. A marker for the confirmation of the transformation to the herbicide inhibiting zeta-carotene desaturase is composed of a DNA sequence coding a polypeptide having an enzymatic activity to convert phytoene to lycopene.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平6-343473

(43) 公開日 平成6年(1994)12月20日

(51) Int. Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/31	Z N A			
A 0 1 H 1/00	Z N A A	8502-2B		
A 0 1 N 63/00	C	9159-4H		
// (C 1 2 N 15/31		9050-4B	C 1 2 N 15/ 00	A
		審査請求 未請求 請求項の数 4	FD (全 20 頁)	最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平5-163926

(22) 出願日 平成5年(1993)6月8日

(71) 出願人 000253503

麒麟麦酒株式会社

東京都渋谷区神宮前6丁目26番1号

(72) 発明者 三 沢 典 彦

神奈川県横浜市金沢区福浦1-13-5 麒麟

麦酒株式会社基盤技術研究所内

(72) 発明者 山 野 重 幸

神奈川県横浜市金沢区福浦1-13-5 麒麟

麦酒株式会社基盤技術研究所内

(74) 代理人 弁理士 佐藤 一雄 (外2名)

(54) 【発明の名称】 プリーチング除草剤耐性植物の製造

(57) 【要約】

【目的】 プリーチング除草剤に対して耐性を有する植物の製造に関する技術を提供する。

【構成】 フィトエンを $\gamma$ -カロチンを経てリコピンに変換する酵素活性を有するポリペプチド(フィトエンデサチュラーゼ)をコードするDNA配列を、その遺伝情報が発現可能な状態で植物に導入することを特徴とする、 $\gamma$ -カロチンデサチュラーゼ阻害除草剤に対する耐性植物の作出法。フィトエンをリコピンに変換する酵素活性を有するポリペプチドをコードするDNA配列からなる、 $\gamma$ -カロチンデサチュラーゼ阻害除草剤に対する形質転換確認用マーカー。

【効果】 植物のフィトエンデサチュラーゼを阻害する除草剤だけでなく植物の $\gamma$ -カロチンデサチュラーゼを阻害する除草剤に対する耐性を植物に与えることができるとともに、これらの除草剤を形質転換時のマーカーとして使用することができる。

1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 フィトエンをリコピンに変換する酵素活性を有するポリペプチドをコードするDNA配列を、その遺伝情報が発現可能な状態で植物に導入することを特徴とする、 $\epsilon$ -カロチンデサチュラーゼ阻害除草剤に対する耐性植物の作出法。

【請求項2】 ポリペプチドが、エルウィニア属由来のフィトエンデサチュラーゼまたはその変異体である、請求項1記載の作出法。

【請求項3】 DNA配列が、トランジットペプチドをコードする塩基配列を有する、請求項1または2記載の作出法。

【請求項4】 フィトエンをリコピンに変換する酵素活性を有するポリペプチドをコードするDNA配列からなる、 $\epsilon$ -カロチンデサチュラーゼ阻害除草剤に対する形質転換確認用マーカー。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】 【発明の背景】

【産業上の利用分野】 本発明は、非光合成細菌であるエルウィニア (*Erwinia*) 由来のフィトエンデサチュラーゼ (*cr t I*) 遺伝子を利用したブリーチング除草剤耐性植物の製造技術に関するものである。更に詳細には、本発明は、ノルフルラゾンやフルリドンのような植物のフィトエンデサチュラーゼを阻害する除草剤だけでなく、*SAN 380H*や*J 852*等の植物の $\epsilon$ -カロチンデサチュラーゼを阻害する除草剤に対して耐性を有する植物の作出方法、ならびに*Erwinia*由来のフィトエンデサチュラーゼ (*cr t I*) 遺伝子の、植物の形質転換におけるマーカー遺伝子としての使用に関するものである。

## 【0002】

【従来の技術】 カロチノイド (*carotenoid*) は、黄～橙～赤色素であり、自然界に最も広く存在する色素である。たとえば、魚類、鳥類、昆虫類およびその他の水産動物の中には、美しい色彩を呈するものが多いが、これらの多くはカロチノイド色素に起因している (松野隆男, 幹渉, 動物におけるカロチノイドの生理機能と生物活性、化学と生物, Vol. 28, No. 4, p. 219-227 (1990) 参照)。カロチノイドは、また、多くの生物で重要な生理的役割を果たしている。植物や光合成微生物では、カロチノイドは光合成の補助色素である他、光酸化的障害から組織や細胞を保護する機能を担っている (Rau, W. "Function of carotenoids other than in photosynthesis". Plant Pigments. London, Academic Press, 1988, p. 231-255. (Goodwin, T. W. ed.) 参照)。動物では、ビタミンAの前駆体である他、種々の癌に対する予防効果や増殖抑制作用があることが知られてきており、健康食品としても注目されつつある (末木一夫,  $\beta$ -カロテン—解明する生理活性、食品と開発, Vol. 24, No. 11, p. 6

2

1-65 (1990) 参照)。光合成を行わない微生物においても、カロチノイド色素を持つものがあるが、これは、光酸化反応から細胞を保護する役割を持つのではないかと推定されている。カロチノイドは、メバロン酸を出発物質として、ステロイドやテルペノイドと途中まで共通なイソプレノイド生合成経路によって合成される。イソプレレン基本生合成系によって生じた $C_{15}$ のファルネシルピロリン酸 (EPP) は、 $C_5$ のイソペンテニルピロリン酸 (IPP) と縮合することにより、 $C_{20}$ のゲラニルゲラニルピロリン酸 (GGPP) が作られる。次に、2分子のGGPPが縮合して、最初のカロチノイドである無色のフィトエン (phytoene) が合成される。フィトエンは、一連の不飽和反応により、フィトフルエン (phytofluene)、 $\epsilon$ -カロチン ( $\epsilon$ -carotene)、ノイロスボレン (neurosporene)、リコピン (lycopene) に変換される。このリコピンは環化反応により $\beta$ -カロチン ( $\beta$ -carotene) に変換され、さらに、水酸基やケト基などが導入され、種々のキサントフィルと総称されるカロチノイドが合成されると考えられている (Britton, G. "Biosynthesis of carotenoids". Plant Pigments. London, Academic Press, 1988, p. 133-182. (Goodwin, T. W. ed.) 参照)。上記したように、カロチノイドは生物的に重要な働きをするにもかかわらず、カロチノイドの生合成を担う遺伝子や酵素の知見は最近までごく限られたものであった。これは、カロチノイドの生合成に関与する酵素が精製するには不安定な膜酵素であったため、酵素の機能や構造の解析が不可能であり、その結果として、これをコードする遺伝子のクローニングができなかったためである。最近になって本発明者らは、植物常在細菌 *Erwinia uredovora* のカロチノイド生合成遺伝子群を、その色調を指標に大腸菌にクローニングし、これらの遺伝子のいろいろな組み合わせを大腸菌で発現させ、大腸菌に蓄積したカロチノイド色素を解析するという独自の手法により、*E. uredovora* のカロチノイドの生合成経路を遺伝子および酵素のレベルで世界で始めて解明した。その結果、*E. uredovora* のカロチノイド生合成経路は、フィトエン、 $\beta$ -カロチン、リコピン、ゼアキサンチンなどの基本的カロチノイドの生合成経路であることを明らかにした (Misawa, N.; Nakagawa, M.; Kobayashi, K.; Yamano, S.; Izawa, Y.; Nakamura, K.; Harashima, K. Elucidation of the *Erwinia uredovora* carotenoid biosynthetic pathway by functional analysis of gene products expressed in *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, Vol. 172, No. 12, p. 6704-6712 (1992)、および、本発明者らによる特許出願特願平3-58786号公報 (特願平2-53255号明細書) : 「カロチノイドの合成に有用なDNA鎖」)。その後、Ausichらは、同じ *Erwinia* 属の *Erwinia herbicola* のカロチノイド生合

3

成経路が *Er. uredovora* のものと同じであることを明らかにした (WO91/13078号公報参照)。本発明者らは、また、*Er. uredovora* のカロチノイド生合成遺伝子群を利用することにより、大腸菌 (*Escherichia coli*)、エタノール生産細菌 *Zymomonas mobilis*、植物病原細菌 *Agrobacterium tumefaciens* などの微生物に、フィトエン、 $\beta$ -カロチン、リコピン、ゼアキサンチンなどの基本カロチノイドを作らせることを可能にした (Misawa, N.; Yaman, S.; Ikenaga, H. Production of  $\beta$ -carotene in *Zymomonas mobilis* and *Agrobacterium tumefaciens* by introduction of the biosynthesis genes from *Erwinia uredovora*. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 57, No. 6, p. 1847-1849 (1991)、および上記の Journal of Bacteriology、および本発明者らによる前記の特許出願明細書)。 *Er. uredovora* のカロチノイド生合成遺伝子群を利用して、これらのカロチノイドを大腸菌に合成させ、解析するという上記の技術は、また、最もよく進んだ大腸菌の遺伝子操作実験の系を、カロチノイドの生合成研究に適用できることを意味した。このことは、生合成酵素の不安定性のために、植物などの生物において今まで遅々として進まなかった遺伝子および酵素のレベルでのカロチノイドの生合成研究を一気に進めることが可能なことを意味した。たとえば、次に示すようなこともその例である。 *Er. uredovora* の crtE と crtB 遺伝子を保持する大腸菌は、フィトエンを合成することが知られており、光合成細菌 *Rhodobacter capsulatus* およびシアノバクテリア *Synechococcus* PCC 7942 においては、突然変異株の利用により、フィトエンデサチューラーゼ (phytoene desaturase) をコードすると考えられる遺伝子が取得されていた。前者の微生物の遺伝子産物の基質はフィトエンであるが、反応産物は明かにされていなかった。後者の微生物においては、基質も反応産物も明らかにされていなかった。Lindenらは、これらの遺伝子を crtE と crtB を保持する大腸菌に導入し、合成されたカロチノイドを HPLC で解析することにより、光合成細菌のフィトエンデサチューラーゼ (crtI 遺伝子産物、CrtI) がノイロスポレンを、またシアノバクテリアのフィトエンデサチューラーゼ (Pds) が  $\zeta$ -カロチンを、共にフィトエンを基質として合成することを見出した (Linden, H.; Misawa, N.; Chamovitz, D.; Pecker, I.; Hirschberg, J.; Sandmann, G. Functional complementation in *Escherichia coli* of different Phytoene desaturase genes and analysis of accumulated carotenoids. Z. Naturforsch., Vol. 46c, p. 1045-1051 (1991) 参照)。また、*Synechococcus* PCC 7942 のフィトエンデサチューラーゼ遺伝

4

子を手掛りとして得られたトマト果実のフィトエンデサチューラーゼ遺伝子 (pds) も、また、フィトエンを基質として  $\zeta$ -カロチンを合成することが、上記の系を用いて明かにされた (Pecker, I.; Chamovitz, D.; Linden, H.; Sandmann, G.; Hirschberg, J. A single polypeptide catalyzing the conversion of phytoene to  $\zeta$ -carotene is transcriptionally regulated during tomato fruit ripening. Proc. Natl. Sci. USA, Vol. 89, p. 4962-4966 (1992) 参照)。植物のフィトエンデサチューラーゼが、フィトエンを基質として  $\zeta$ -カロチンまでしか合成できないので、植物内には、 $\zeta$ -カロチンからリコピンを合成する別の酵素 ( $\zeta$ -カロチンデサチューラーゼ) が存在するはずである。Lindenらは、この酵素をコードする遺伝子 (zds) を、*Er. uredovora* のカロチノイド生合成遺伝子等を利用してシアノバクテリア *Anabaena* PCC 7120 よりクローニングし、この遺伝子産物が  $\zeta$ -カロチンからリコピンを合成する反応を触媒することを明かにした (Linden, H.; Vioque, A.; Sandmann, G. Isolation of a carotenoid biosynthesis gene coding for  $\zeta$ -carotene desaturase from *Anabaena* PCC 7120 by heterologous complementation. FEMS Microbiol. Lett., Vol. 106, p. 99-103 (1993) 参照)。しかし、この遺伝子の塩基配列は未報告である。

#### 【0003】(発明の概要)

【発明が解決しようとする課題】図1は、植物およびシアノバクテリアと *Erwinia* における  $\beta$ -カロチンまでの生合成経路を遺伝子および酵素 (遺伝子産物) のレベルで、以上述べてきたことを含めて、現在までに明かにされた知見をまとめたものである。GGPPシンターゼとフィトエンシンターゼは、植物 (あるいはシアノバクテリア) と *Erwinia* 間で、全く同じ機能を示し (Sandmann, G.; Misawa, N. New functional assignment of the carotenogenic genes crtB and crtE with constructs of these genes from *Erwinia* species. FEMS Microbiology Letters, Vol. 90, p. 253-258 (1992) 参照)、アミノ酸配列レベルでも、30%前後のアイデンティティーという意義深いホモロジーを示した。したがって、GGPPシンターゼとフィトエンシンターゼは、種を超えて良く保存されているようである。一方、フィトエンデサチューラーゼにおいては、植物 (あるいはシアノバクテリア) と *Erwinia* 間で、その機能は異なっている、すなわち、前者のフィトエンデサチューラーゼが、フィトエンを基質として  $\zeta$ -カロチンまでしか合成できないのに対して、後者のフィトエンデサチューラーゼ CrtI はフィトエンを基質としてリコピンまで合成することができる。アミノ酸配列レベルでも、両者のフィトエンデサチューラーゼにホモロジーは一部の N-末端域を除いて見出されない。また、前述したように、両者のフィトエンデサチューラーゼの機能は、光合成細菌のもの

とも異なっていることから、本酵素は多様性を獲得していると考えられる。植物（あるいはシアノバクテリア）のフィトエンデサチユラーゼは、ノルフルラゾン（norflurazon）やフルリドン（fluridon）等のブリーチング除草剤と呼ばれる除草剤の作用部位である（Sandmann, G.; Boger, P. "Inhibition of carotenoid biosynthesis by herbicides". Target Sites of Herbicide Action. Boca Raton, FL: CRC Press, 1989, p.25-44. (Boger, P.; Sandmann, G. eds) 参照）。ノルフルラゾンやフルリドンは酵素を直接に攻撃する非競合阻害剤（non-competitive inhibitor）であることが知られている。ErwiniaのフィトエンデサチユラーゼCrtIは、植物（あるいはシアノバクテリア）のものと、前述したように、機能や構造において異なっているので、これらのブリーチング除草剤に抵抗性であると予想することができる。事実、Ausichらは、Erwinia herbicolaのフィトエンデサチユラーゼ遺伝子crtIを、葉緑体の移行に必要なトランジットペプチド配列を付加してタバコに導入することにより、0.8 μg/ml (2.6 μM) のノルフルラゾンを含む培地で正常に生育するタバコ形質転換体を得たと記述している（前記WO91/13078号公報参照）。ただ、この公報では、ノルフルラゾンを含む培地で正常に生育するタバコ形質転換体において、Er. herbicolaのフィトエンデサチユラーゼ遺伝子crtIがタバコ染色体に組み込まれ、その転写、翻訳が行われているということや、合成されたcrtI遺伝子産物がタバコ葉の葉緑体に輸送され、トランジットペプチドがプロセスされていることが実験的に確認されていないので、形質転換体だと考えられたタバコが、実際は、順化または順養によるノルフルラゾン自然抵抗性株であった可能性がある。事実、本発明者らは、3 μM濃度のノルフルラゾンを含む培地では、タバコin vitro植物が正常に生育できるようになる場合があることを実験的に確認している。一方、SAN380HやJ852等のブリーチング除草剤は、 $\zeta$ -カロチンからリコピンまでのデサチユレーション（脱水素）反応を阻害する除草剤であることが知られている（Boger, P.; Sandmann, G. "Modern herbicides affecting typical plant processes". Chemistry of Plant Protection. Vol. 6. Springer Publ., 1990, p.173-216. (Bowers, W.S.; Ebinger, W., Martin, D., Wegler, R. eds) 参照）。in vivo, in vitro共に、SAN380HまたはJ852で処理した植物体は $\zeta$ -カロチンを蓄積するようになるので、これらは $\zeta$ -カロチンデサチユラーゼ酵素を直接に攻撃する除草剤であると考えられている。 $\zeta$ -カロチンデサチユラーゼを阻害する除草剤に対するErwiniaのフィトエンデサチユラーゼcrtIを導入した植物体の抵抗性に関しては、前述したように、最近、ようやく、シアノバクテリアから $\zeta$ -カロチンデサチ

ラーゼをコードする遺伝子がクローニングされたばかりであり、そのアミノ酸配列がまだ明かにされていないことや、この抵抗性に関する研究例が現在までに全く無いことから、ErwiniaのcrtI遺伝子を利用して、 $\zeta$ -カロチンデサチユラーゼ阻害剤に対する抵抗性を植物に与えられるかどうかは全くわからないのが現状であった。本発明は、上述のような点に鑑み、ブリーチング除草剤に対して耐性を有する植物の製造に関する技術を提供することを目的とするものである。

#### 10 【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、非光合成細菌エルウィニア（Erwinia）のフィトエンデサチユラーゼ（crtI）遺伝子を利用することにより、ノルフルラゾンやフルリドンのような植物のフィトエンデサチユラーゼを阻害する除草剤だけでなく、SAN380HやJ852等の植物の $\zeta$ -カロチンデサチユラーゼを阻害する除草剤に対する耐性を植物に与えることができることを見出し、この知見をもとに本発明を完成させるに至った。すなわち、本発明による $\zeta$ -カロチンデサチユラーゼ阻害除草剤に対する耐性植物の作出法は、フィトエンをリコピンに変換する酵素活性を有するポリペプチドをコードするDNA配列を、その遺伝情報が発現可能な状態で植物に導入すること、を特徴とするものである。上記作出法によって得られる $\zeta$ -カロチンデサチユラーゼ阻害除草剤に対する耐性植物は、フィトエンをリコピンに変換する酵素活性を有するポリペプチドをコードするDNA配列が導入され、上記酵素活性を有するポリペプチドを産生する能力を有すること、を特徴とするものである。さらに、本発明は、上記DNA配列の、植物の形質転換におけるマーカー遺伝子としての使用、すなわち、フィトエンをリコピンに変換する酵素活性を有するポリペプチドをコードするDNA配列からなる、 $\zeta$ -カロチンデサチユラーゼ阻害除草剤に対する形質転換確認用マーカー、にも関する。

【0005】（発明の具体的説明）本発明は、フィトエンをリコピンに変換する酵素活性を有するポリペプチド、すなわちフィトエンデサチユラーゼ（以下、crtIともいう）をコードするDNA配列（以下、フィトエンデサチユラーゼ遺伝子もしくはcrtI遺伝子ともいう）を利用することにより、植物のフィトエンデサチユラーゼを阻害する除草剤のみならず、植物の $\zeta$ -カロチンデサチユラーゼを阻害する除草剤に対して耐性を有する植物の製造に関する技術を提供するものである。

#### 【0006】 $\zeta$ -カロチンデサチユラーゼ阻害除草剤に対する耐性植物の製造

本発明における $\zeta$ -カロチンデサチユラーゼ阻害除草剤に対する耐性植物は、フィトエンをリコピンに変換する酵素活性を有するポリペプチドをコードするDNA配列（フィトエンデサチユラーゼ遺伝子）が導入され、上記酵素活性を有するポリペプチド（フィトエンデサチ

一ゼ)を産生する能力を有することを特徴とするものであり、このような植物は、本発明作出法により、すなわち、フィトエンをリコピンに変換する酵素活性を有するポリペプチドをコードするDNA配列(フィトエンデサチュラーゼ遺伝子)を、その遺伝情報が発現可能な状態で植物に導入することを特徴とする方法により作出することができる。フィトエンデサチュラーゼ遺伝子導入の対象となる植物としては、光合成を行なう任意の高等植物が使用可能であり、特に限定されないが、具体的には穀類あるいはタバコ、ベチュニア、ジャガイモなど、好ましくはイネ、トウモロコシ、コムギ、オオムギなどがあげられる。上記DNA配列(フィトエンデサチュラーゼ遺伝子)は、コードするポリペプチドが、フィトエンをリコピンに変換する酵素活性を有するものであれば任意のアミノ酸配列に対応するものでありうるが、その代表例としては非光合成細菌であるエルウィニア(*E. coli*)属由来のフィトエンデサチュラーゼ遺伝子(*crtI*遺伝子)のDNA配列をあげることができる。このエルウィニア属由来の*crtI*遺伝子は、フィトエンを $\beta$ -カロチンを経てリコピンに変換するフィトエンデサチュラーゼのアミノ酸配列をコードするものである。エルウィニア属細菌由来の遺伝子としては、具体的にはたとえば、*E. coli* *uredovara*の*crtI*遺伝子を使用することができる。この*crtI*遺伝子の塩基配列の詳細については、前記の論文Journal of Bacteriology, vol.172, p.6704-6712 (1992)に、コードされるポリペプチド(フィトエンデサチュラーゼ(*CrtI*))のアミノ酸配列と共に示されている。使用するDNA配列は、この論文に示されたものの他に、同一のポリペプチドをコードし縮重コドンにおいてのみ塩基配列が異なる縮重異性体でもよいことはいうまでもなく、さらには、アミノ酸配列中の一部のアミノ酸の置換、欠失、挿入あるいは付加などのアミノ酸変異もしくは変更があっても、フィトエンデサチュラーゼ活性を維持しているポリペプチドに対応する塩基配列を有するものであれば使用可能である。また、エルウィニア属細菌由来の遺伝子としては、*E. coli* *herbicola*の*crtI*遺伝子(前記WO 91/13078号公開公報参照)も例示され、この塩基配列に関しても、上記*E. coli* *uredovara*の場合と同様に、縮重異性体あるいはアミノ酸変異に対応する塩基配列のものが使用できる。これらのDNA配列は、一部または全部を化学合成することができるが、好ましくは細菌等の取得源から常法によりフィトエンデサチュラーゼをコードするゲノム遺伝子あるいはcDNAを単離して得ることができる(上記公開公報等参照)。上記のようなDNA配列(フィトエンデサチュラーゼ遺伝子)は、プラスミド等のベクターに含有された形で、その遺伝情報が発現可能な状態で植物に導入して形質転換することにより、ブリーチング除草剤に対する耐性植物を作出することができる。上記ベ

クターとしては、たとえばバイナリーベクターであれば任意のものが使用可能であるが、好ましくはpBI 121などをあげることができる。DNA配列を発現させてそれがコードするポリペプチド(フィトエンデサチュラーゼ)を産生させるためには、そのコーディング領域の他に、発現調節配列が必要であり、そのような発現調節配列としてはたとえばカリフラワーモザイクウイルス由来の35Sプロモーターなどを用いることができる。さらに、産生されたポリペプチド(フィトエンデサチュラーゼ)を細胞の特定の場所(たとえば葉緑体)に輸送したい場合には、コーディング領域の上流に輸送に必要なトランジットペプチドをコードする塩基配列をさらに付加することによりその輸送が可能となる。トランジットペプチドをコードする配列としては、たとえば、図2に示されるように、エンドウのRubisco小サブユニットのトランジットペプチドをコードするDNA配列を利用することができる。したがって、本発明における「ポリペプチドをコードするDNA配列」は、このポリペプチドのコーディング領域のみを限定して指すのではなく、コーディング領域と共に発現調節配列やトランジットペプチドをコードする配列などを含むようなDNA配列をも包含するものとする。発現調節配列やトランジットペプチドをコードする配列などの連結あるいはこれらを含む発現ベクター等の作製に関する基本的な事項については、一般的な公知の方法(たとえば長田敏行著:「植物細胞の遺伝子操作」、蛋白質・核酸・酵素(臨時増刊)1983:12, Vol. 28, No. 14, 共立出版株式会社, p1551-1568の記載による方法など)を用いることができる。また、このDNA配列(フィトエンデサチュラーゼ遺伝子)による植物の形質転換、すなわち植物に外来遺伝子を導入する方法としては、すでに報告され確立されている種々の方法、たとえばアグロバクテリウムのTiプラスミドをベクターとして用いる方法や、植物プロトプラストにエレクトロポレーションで遺伝子を導入する方法などを、遺伝子を導入しようとする植物の種類等に応じて適宜用いることができる(たとえば岡田吉美、飯田滋:「遺伝子工学的分子育種技術の現状と将来」植物バイオテクノロジーII, 山田康之・岡田吉美編、現代化学・増刊20, 東京化学同人, p233-264参照)。外来遺伝子、すなわちフィトエンデサチュラーゼ遺伝子を導入する対象となる植物は前記した通りであるが、遺伝子導入のための植物材料としては、導入法等に応じて、葉、茎、根など任意の材料の中から適宜選択して用いることができる。DNA配列(フィトエンデサチュラーゼ遺伝子)が導入された形質転換体は、通常の方法(たとえば本吉総男、宇垣正志:「コートタンパク質遺伝子によるウイルス抵抗性のトマト」植物バイオテクノロジーII, 山田康之・岡田吉美編、現代化学・増刊20, 東京化学同人, p153-161参照)により再生させ、幼植物体から馴化植物体にまで生育した形質転換植物を得ることができ

る。この形質転換植物は、フィトエンを $\zeta$ -カロチンを経てリコピンに変換するフィトエンデサチュラーゼを産生する能力を有し、ノルフルazonやフルリドンのような植物のフィトエンデサチュラーゼを阻害する除草剤だけでなく、SAN380HやJ852等の植物の $\zeta$ -カロチンデサチュラーゼを阻害する除草剤に対して耐性を獲得したものである。なお、上記した種々の薬剤に対する耐性試験は、一般的な公知の方法（たとえば、「微生物学実験法」：微生物研究法懇談会編，1975，講談社，I V. 生理的性状観察法，p199-254に記載の方法）により実施することができる。

#### 【0007】 $\zeta$ -カロチンデサチュラーゼ遺伝子およびコードされるポリペプチド

上記SAN380HあるいはJ852等のブリーチング除草剤の作用部位となる $\zeta$ -カロチンデサチュラーゼをコードする遺伝子に関しては、最近シアノバクテリア *Anabaena* (PCC7120) からこの遺伝子がクローニングされたばかりであり（前記FEMS Microbiol. Lett., Vol.106, p.99-103 (1993) 参照）、そのアミノ酸配列がまだ明かにされていないことや、この抵抗性に関する研究例が現在までに全く無いことから、*Erwinia* のフィトエンデサチュラーゼ遺伝子を利用して、 $\zeta$ -カロチンデサチュラーゼ阻害剤に対する抵抗性を植物に与えられるかどうかは全くわからない現状であった。さらに、本発明者らは後記の実験例9に示されているように、最近シアノバクテリアからクローニングされたこの $\zeta$ -カロチンデサチュラーゼ遺伝子 *zds* の塩基配列をダイデオキシ法により決定し、そこから推定したアミノ酸配列をすでに報告されているいろいろな生物種のフィトエンデサチュラーゼと比較した。その結果、驚くべきことに、この $\zeta$ -カロチンデサチュラーゼ *zds* 遺伝子産物は、シアノバクテリアや植物のフィトエンデサチュラーゼと、一部のN-末端領域を除いてホモロジーはほとんど見出されず、むしろ、*Erwinia* や *Rhodobacter capsulatus* のフィトエンデサチュラーゼ *CrtI* と約35%という意義深いホモロジーを示した。このことから、*Erwinia* のフィトエンデサチュラーゼと植物の $\zeta$ -カロチンデサチュラーゼとは構造がよく似ていると考えられるので、当業者であれば、*Erwinia* のフィトエンデサチュラーゼ遺伝子は、植物の $\zeta$ -カロチンデサチュラーゼを阻害する除草剤に対する抵抗性を与えることはできないと予測するであろう。図3～5に、シアノバクテリア (*Anabaena*) 由来の $\zeta$ -カロチンデサチュラーゼ遺伝子の塩基配列およびそこから推定したアミノ酸配列を示してあるが（後記配列表参照）、この $\zeta$ -カロチンデサチュラーゼ遺伝子の塩基配列およびコードされるポリペプチドのアミノ酸配列は、これまで知られていなかったものであり、本発明において初めて明らかにされたものである。

#### 【0008】フィトエンデサチュラーゼ遺伝子の用途

本発明において、上記の、フィトエンをリコピンに変換する酵素活性を有するポリペプチドをコードするDNA配列、すなわちフィトエンデサチュラーゼ (*crtI*) 遺伝子（代表的には、エルウィニア属由来のものは、種々の外来遺伝子（たとえば薬剤耐性遺伝子など）による植物の形質転換実験等において、SAN380HあるいはJ852等の植物 $\zeta$ -カロチンデサチュラーゼを阻害するブリーチング除草剤に対する形質転換確認用の遺伝子マーカーとして使用することができる。これまでのところ、植物の形質転換実験は、植物病原菌 *Agrobacterium tumefaciens* のTiプラスミド系を用いて行なわれるのが一般的であるが、外来遺伝子が植物に導入されたことを示すマーカー遺伝子は、抗生物質耐性遺伝子であるカナマイシンやハイグロマイシン耐性遺伝子ぐらいしか実際に使用できるものはなく、従ってこれらの薬剤に抵抗性を示す種々の植物種の形質転換あるいは一つの植物体への複数の遺伝子の導入実験等が、形質転換有無の確認の点から困難なものとなっていた。後述の実験例8において、フィトエンデサチュラーゼ (*crtI*) 遺伝子およびカナマイシン耐性遺伝子を含むプラスミドを有するアグロバクテリウム (*A. tumefaciens*) の感染によって葉片（タバコ植物）を形質転換し、これを $\zeta$ -カロチンデサチュラーゼ阻害剤 (SAN380H) およびカナマイシンの有無の培地上で培養したところ、SAN380Hを含む培地上で、異常な生育、すなわち両薬剤を含まないコントロール培地上の場合と比べて生育の悪い多数の白色の不定芽形成、の中に一部正常に生育しカナマイシンを含む培地の場合より生育のよい緑色の不定芽形成が観察され、緑色の不定芽は、カナマイシンを含む培地上でも正常に生育した。この緑色の不定芽の部分再生培地上で培養して幼植物体を形成させ、葉の染色体DNAを分析したところ、フィトエンデサチュラーゼ遺伝子とカナマイシン耐性遺伝子との両方が組み込まれていることが確認され、このことから、選択マーカーとしてのSAN380Hにより、外来遺伝子としてのカナマイシン耐性遺伝子が導入された植物体、すなわち形質転換体を選抜できたということがわかった。したがって、*Erwinia* のフィトエンデサチュラーゼ遺伝子は、種々の外来遺伝子（たとえば薬剤耐性遺伝子など）による植物の形質転換実験等において、SAN380H等の $\zeta$ -カロチンデサチュラーゼ阻害剤に対するマーカー遺伝子として使用できることが確認できた。

#### 【0009】

【実施例】以下の実施例は、本発明をさらに具体的に説明するためのものであり、本発明を限定するものではない。

#### 実験例1：プラスミドpYPIET4の作製

ここで用いられた通常の遺伝子組換え実験は、特に言及されていない場合は、標準的な方法 (Sambrook, J.; Fr

itsch, E.F.; Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) に基づいている。エンドウのリブローソム、5-2リン酸 (Rubisco) 前駆体のトランジットペプチドをコードする配列 (tp) は、プラスミド pSNIF83 (Schreier, P.H.; Seftor, E.A.; Scheil, J.; Bohnet, H.J. The use of nuclear-encoded sequences to direct the light-regulated synthesis and transport of a foreign protein into plant chloroplasts. The EMBO Journal, Vol. 4, p.25-32 (1985) 参照) から 204 bp の HindIII - SphI 断片として単離した。次に、Er. uredoovora のフィトエンデサチュラーゼ遺伝子 crtI を有するプラスミドである pCRT-I (Fraser, P.D.; Misawa, N.; Lindén, H.; Yamano, S.; Kobayashi, K.; Sandmann, G. Expression in *E. coli*, purification and reactivation of the recombinant *Erwinia uredoovora* phytoene desaturase. J. Biol. Chem., Vol. 267, p.19819-19895 (1992) 参照) を BamHI と HindIII で二重消化した後、N末の一部を欠失した crtI を含む 1.57 kb の BamHI - HindIII 断片を単離した。次に、crtI の開始コドンから BamHI 部位までの 76 bp の配列を合成した。この crtI の開始コドンには、SphI の粘着末端を生じるようにデザインした。そして、上記で得た 3 種類の断片を、tp を含む 204 bp HindIII - SphI 断片、合成した 76 bp SphI - BamHI 断片、N末の一部を欠失した crtI を含む 1.57 kb BamHI - HindIII 断片の順で結合した。こうして得た 1.84 kb の HindIII 断片を、Klenow 酵素で処理した後、東洋紡 (株) から購入したバイナリーベクター pBI121 から SmaI と SacI による二重消化により  $\beta$ -グルクロニダーゼ遺伝子を除いたものに、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の 35S プロモーターの転写のリードスルーを受けるように挿入した。こうして得たプラスミドを pYPIET4 と名づけた。pYPIET4 における、tp-crtI 遺伝子を含む 1.84 kb の HindIII 断片部分を図 2 に示した。

【0010】実験例 2: アグロバクテリウムを介した植物体の形質転換

プラスミド pYPIET4 は、ヘルパープラスミド pRK2013 を用いた接合伝達法 (Stuy, J.H. Plasmid transfer in *Haemophilus influenzae*. Journal of Bacteriology, Vol. 139, p.520-529 (1979) 参照) により、*Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 に導入された。プラスミド pYPIET4 を有する *A. tumefaciens* 接合体は、リーフディスク法 (Horsch, R.B.; Fry, J.E.; Hoffmann, N.L.; Eichholtz, D.; Rogers, S.G.; Fraley, R.T. A simple and general method for transferring

genes into plants. Science, Vol. 227, p.1229-1231 (1985) 参照) によりタバコ植物 (*Nicotiana tabacum* varieties Samsun) を形質転換するのに用いられた。タバコ形質転換体の選択は、100  $\mu$ g/ml のカナマイシン、500  $\mu$ g/ml のカルベニシリン、1mg/l のベンジルアデニン、0.1mg/l の NAA を含む MS 培地上で、26℃、16 時間光照射下、8 時間暗黒下の条件で行われた。ここで得られた不定芽を、植物ホルモンを含まない MS 培地上に移し培養することにより根を形成させた。根を形成した幼植物は、土壌に移し、温室で栽培した。また、増殖、維持を行う場合は、根を形成した幼植物の頂芽または葉柄付きの茎を切り取り、植物ホルモンを含まない別の MS 培地に置床し、培養を行った。

【0011】実験例 3: フィトエンデサチュラーゼ遺伝子 crtI の植物体での発現

上記の方法により、計 28 株のカナマイシン耐性形質転換タバコを単離した。crtI 遺伝子産物 (CrtI) に対する抗体を用いたウエスタンブロット法により、これらの形質転換体の葉中での crtI 遺伝子の発現を調べたところ、形質転換植物の半数において crtI 遺伝子の発現が認められ、トランジットペプチドが切断された CrtI 蛋白質自身の大きさのバンドを現した。したがって、これら半数の形質転換植物において、葉中で合成された tp-crtI 遺伝子産物は、トランジットペプチドの情報に基づいて葉緑体に移行後、トランジットペプチドが切断されたと考えられた。このことは、また、CrtI に対する抗体を用いた免疫金粒子検出実験により確かめられた。すなわち、発現が確認されたタバコ形質転換体の 1 つ (ET4-1) からの葉を用いて、CrtI の抗体に吸着する金粒子で反応を行った後、その葉の超薄切片を電子顕微鏡で観察した。この実験方法は、Vivo, A.; Andreu, J.M.; Vina, S.de la.; Felipe, M.R.de. Leghemoglobin in lupin plants (*Lupinus albus* cv Multolupa). Plant Physiology, Vol. 90, p.452-457 (1989) に基づいて行った。その結果、ET4-1 において、crtI の大部分が葉緑体内に取り込まれ、その内の 89% がチラコイド膜に移行していることがわかった。なお、コントロールとして行った非形質転換タバコにおける免疫金粒子の反応は、ET4-1 の 10% 以下であった。

【0012】実験例 4: フィトエンデサチュラーゼ遺伝子 crtI 発現植物体のノルフルラゾン耐性

植物ホルモンを含まない MS 培地で維持中のトランスジェニックタバコ (ウエスタンブロット実験により crtI 遺伝子の発現が確認されたもの) 14 株から、葉柄付きの茎 (脇芽増殖可能なもの) を切り取り、3  $\mu$ M のノルフルラゾン (SAN9789, 4-chloro-5-methylamino-2-(3-trifluoromethylphenyl)-pyridazin-



3 (2H) one) を含む植物ホルモンを含まないMS培地に置床し、26℃、16時間光照射下、8時間暗黒下の条件で培養を行った。コントロールとして、形質転換しないタバコも同様に行った。その結果、ET4-1を含む11株には、部分的なブリーチング（葉が白くなること）が見られたが、コントロールと比べて、ブリーチングの程度は小さかった。残りの3株には、全くブリーチングは見られなかった。したがって、前者を中耐性株、後者を強耐性株とした。なお、コントロールとして、同一のin vitroタバコ植物体（形質転換しないもの）から取得した複数の葉柄付きの茎を3μMのノルフルラゾンを含む植物ホルモンを含まないMS培地に置床し上記と同様の条件で培養を行うと、コントロールの中には、外見上、中耐性株とほぼ同等の耐性を有するものも現われた。したがって、中耐性株の場合、このデータだけでは、トランスジェニックタバコの除草剤耐性の証明としては弱いので、さらに、次に示すように、\*

表1 タバコ葉のカロチノイド色素、フィトエン、クロロフィル含量

色 素	コントロール植物	コントロール植物	ET4-1形質転換体
3μMノルフルラゾン存在下			
カロチノイド色素	1. 3	0. 2	0. 9
フィトエン	<0. 1	0. 6	0. 1
クロロフィル	8. 9	1. 5	6. 1

3μMノルフルラゾン存在下、ET4-1では、カロチノイド色素とクロロフィル含量は、ノルフルラゾンを加えないコントロールと比べて、30%程の減少に過ぎないが、非形質転換体では、カロチノイド色素、クロロフィル含量ともに80%以上の減少を示し、フィトエンデサチウラーゼの基質であるフィトエンの蓄積が認められた。次に、ET4-1と非形質転換タバコを土壌に移植し、1週間、通常の水で栽培した後、3μMノルフルラゾンを含む水を与え続けた。非形質転換タバコでは、ノルフルラゾン添加後、6日目にブリーチングが認められ始めたのに対し、ET4-1では、ノルフルラゾン添加後、11日目にブリーチングが認められ始めた。以上の結果より、ET4-1は、ノルフルラゾンに対して、ある程度の抵抗性を獲得していると結論した。同様に、ノルフルラゾンだけでなく、他のフィトエンデサチウラーゼ阻害剤であるフルリドン (EL171、1-methyl-3-phenyl-5-(3-trifluoromethylphenyl)-4(1H)-pyridone)、ε-カロチンデサチウラーゼ阻害剤であるSAN380H（下記構造式参照）およびJ852（下記構造式参照）に対しても、抵抗性が上昇していることがわかった。さらに、これらの植物体から種子を取り、種子から発芽した幼植物を用いて、このブリーチ

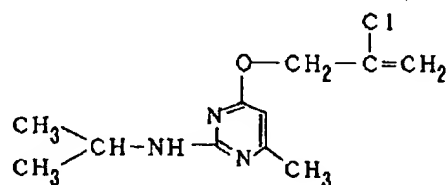
\*種々の実験を行った。

【0013】実験例5：ブリーチング除草剤中耐性トランスジェニック植物の分析

免疫金粒子検出実験によりcrt1遺伝子産物の葉緑体への取り込みが確かめられたトランスジェニックタバコET4-1を用いて、種々のブリーチング除草剤抵抗性試験を行った。in vitroで培養されているET4-1と非形質転換タバコから、それぞれ、葉柄付きの茎（腋芽増殖可能なもの）を切り取り、3μMのノルフルラゾンを含む植物ホルモンを含まないMS培地に置床し、26℃、16時間光照射下、8時間暗黒下の条件で、17日間、培養を行った。両者にブリーチングが認められたが、ブリーチングの程度は、ET4-1よりコントロールの非形質転換タバコの方が強かった。これらの葉を用いてカロチノイド含有量とクロロフィル含量の定量を行った結果を表1に示す。

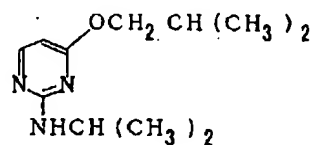
ング除草剤抵抗性が次世代に受け継がれることを確認した。

30 【化1】



SAN 380H

40 【化2】



J852

【0014】実験例6：ブリーチング除草剤強耐性トランスジェニック植物の分析

50 3μMのノルフルラゾンを含むMS培地で全くブリーチ

15

ングを生じなかった3株のトランスジェニックタバコのうち1株ET4-208を用いて、さらなるブリーチング除草剤抵抗性試験を行った。in vitroで培養されているET4-208と非形質転換タバコから、それぞれ葉柄付きの茎（脇芽増殖可能なもの）を切り取り、10 $\mu$ Mのノルフルラゾンを含み植物ホルモンを含まないMS培地、および、3 $\mu$ Mのフルリドンを含み植物ホルモンを含まないMS培地に置床し、26℃、16時間光照射下、8時間暗黒下の条件で、28日間、培養を行った。その結果、10 $\mu$ Mのノルフルラゾン、3 $\mu$ Mのフルリドンともに、非形質転換タバコにおいては、強いブリーチングが生じ、茎葉は白色を呈した。一方、ET4-208には、10 $\mu$ Mのノルフルラゾン、3 $\mu$ Mのフルリドンともに全くブリーチングは認められなく、このin vitro植物体は、除草剤を含まない培地でのコントロールタバコと同程度に正常に生育した。さらに、10 $\mu$ Mのノルフルラゾン存在下のET4-208の茎葉を用いて、カロチノイド含量とクロロフィル含量の定量を行い、クロロフィル、カロチノイド含量ともに、ノルフルラゾンを加えないコントロールと同じであることを確認した。次に、植物ホルモンを含まないMS培地で発根しているET4-208と非形質転換タバコを土壌に移植し、1週間、通常の水で栽培した後、3 $\mu$ Mノルフルラゾンを含む水を与え続けた。非形質転換タバコでは、ノルフルラゾン添加後、6日目にブリーチングが認められ始め、25日以内に枯死したが、ET4-208は、全くブリーチングを呈すること無く正常に生育し、ノルフルラゾン添加後2ヶ月以内に種子を形成した。以上の結果より、ET4-208は、ノルフルラゾンやフルリドン等の植物型のフィトエンデサチユラーゼを阻害するブリーチング除草剤に対して強力な耐性能を獲得していることがわかった。

【0015】実験例7：トランスジェニック植物の $\epsilon$ -カロチンデサチユラーゼ阻害剤に対する耐性試験  
植物型のフィトエンデサチユラーゼを阻害するブリーチング除草剤に対して耐性であることがわかったトランスジェニックタバコET4-208を用いて、 $\epsilon$ -カロチンデサチユラーゼを阻害するブリーチング除草剤に対する抵抗性試験を行った。in vitroで培養されているET4-208と非形質転換タバコから、それぞれ、葉柄付きの茎（脇芽増殖可能なもの）を切り取り、10 $\mu$ MのSAN380Hを含み植物ホルモンを含まないMS培地、および、20 $\mu$ MのJ852を含み植物ホルモンを含まないMS培地に置床し、26℃、16時間光照射下、8時間暗黒下の条件で、14日間、培養を行った。その結果、10 $\mu$ MのSAN380H、20 $\mu$ MのJ852ともに、非形質転換タバコにおいては、強いブリーチングが生じ、茎葉は白色を呈した。一方、ET4-208には、10 $\mu$ MのSAN380H、20 $\mu$ MのJ852ともに全くブリーチングは認められなく、こ

16

のin vitro植物体は、除草剤を含まない培地でのコントロールタバコと同程度に正常に生育した。さらに、10 $\mu$ M SAN380H存在下のET4-208の茎葉を用いて、カロチノイド含量とクロロフィル含量の定量を行い、クロロフィル、カロチノイド含量ともに、SAN380Hを加えないコントロールと同じであることを確認した。次に、植物ホルモンを含まないMS培地で発根しているET4-208と非形質転換タバコを土壌に移植し、5日間、通常の水で栽培した後、10 $\mu$ MのJ852を含む水を与え続けた。非形質転換タバコでは、J852添加後、10日目にブリーチングが認められ始め、40日以内に枯死したが、ET4-208は、全くブリーチングを呈すること無く正常に生育し、J852添加後2ヶ月以内に種子を形成した。以上の結果より、ET4-208は、ノルフルラゾンやフルリドン等の植物型のフィトエンデサチユラーゼを阻害するブリーチング除草剤に対してだけでなく、SAN380HやJ852等の $\epsilon$ -カロチンデサチユラーゼを阻害するブリーチング除草剤に対しても強力な耐性能を獲得していることがわかった。

【0016】実験例8： $\epsilon$ -カロチンデサチユラーゼ阻害剤に対するマーカー遺伝子

*Erwinia*のフィトエンデサチユラーゼ遺伝子crt1が $\epsilon$ -カロチンデサチユラーゼ阻害剤に対するマーカー遺伝子として使えることを示すため、以下の実験を行った。プラスミドpYPIET4を有するA. tumefaciens接合体を用いて、リーフディスク法（Horsch, R.B.; Fry, J.E.; Hoffmann, N.L.; Eichholtz, D.; Rogers, S.G.; Fraley, R.T. A simple and general method for transferring genes into plants. Science, Vol. 227, p.1229-1231 (1985)参照）により、タバコ植物 (*Nicotiana tabacum* varieties Samsun) への感染処理を行った。2日間、フィーダープレート上で培養した後、感染処理したタバコの葉を、カナマイシンの代わりに20 $\mu$ MのSAN380Hを含み、300 $\mu$ g/mlのクラフォラン、1mg/lのベンジルアデニン、0.1mg/lのNAAを含むMSプレート上に移し、26℃、16時間光照射下、8時間暗黒下の条件で培養を行った。コントロールとして、300 $\mu$ g/mlのクラフォラン、1mg/lのベンジルアデニン、0.1mg/lのNAAのみを含むMSプレート、および、100 $\mu$ g/mlのカナマイシンを含み、300 $\mu$ g/mlのクラフォラン、1mg/lのベンジルアデニン、0.1mg/lのNAAを含むMSプレート上にも置床し、同様にして培養を行った。そして、これら各々のタバコ葉のディスクを、2週間おきに、同じプレート上に置床した。SAN380Hもカナマイシンも含まないコントロールのプレート上では、培養2週間目から多くの不定芽が形成され始め、培養4週間目には、葉ディスク一面にカルスと不

定芽が形成された。培養4週間目では、1プレートあたり(6個のディスクを置床したプレート1つあたり)、緑色カルスから30個程度の緑色の不定芽が形成されていた。一方、カナマイシンを含む通常の形質転換選抜用のプレート上では、培養4週間目には、1プレートあたり、1-2個の不定芽しか形成されていなかった。カナマイシンを含まないプレート上で形成された不定芽の大部分は形質転換体ではないと考えられた。一方、カナマイシンの代わりにSAN380Hを含むプレート上では、培養4週間目には、1プレートあたり、20個程度の白い不定芽が観察されたが、SAN380Hもカナマイシンも含まないコントロールのものとは比べて、不定芽の生育は悪かった。そして、この多くの白い不定芽に混って、1プレートあたり、3個の正常に生育する緑色の不定芽が形成されていた。この緑色の不定芽の生育は、100μg/mlのカナマイシンを含むプレートで生えてきたものより優れていた。また、この緑色の不定芽を単離し、カナマイシンを含むMSプレート上に置床しても正常に生育することができた。次に、SAN380Hを含むプレート上で形成した緑色の不定芽を単離し、植物ホルモンを含まないMS培地上に移し培養することにより幼植物体を形成させた。これらの幼植物体の葉から染色体DNAを取得し、サザン分析を行うことにより、crtI遺伝子とカナマイシン耐性遺伝子NPTIIとの両方が組み込まれていることを確認した。このことは、選択マーカーとしてのSAN380Hにより、外来遺伝子としてのカナマイシン耐性遺伝子が導入された植物体を選抜できたということを意味している。したがって、*Erwinia*のフィトエンデサチュラーゼ遺伝子crtIはSAN380H等のγ-カロチンデサチュラーゼ阻害剤に対するマーカー遺伝子として使えることが明かとなった。

【0017】実験例9:シアノバクテリアのγ-カロチンデサチュラーゼ遺伝子zdsの塩基配列の決定  
Lindenらによってクローニングされたシアノバクテリア*Anabaena* PCC7120のγ-カロチンデサチュラーゼ遺伝子zds (Linden, H.; Vioque, A.; Sandmann, G. Isolation of a carotenoid biosynthesis gene coding for γ-carotene desaturase from *Anabaena* PCC7120 by heterologous complementation. FEMS Microbiol. Lett., Vol. 106, p.99-103 (1993)参照)の塩基配列の決定を、エキソヌクレアーゼIIIとマングビーンヌクレアーゼを組み合わせたデレション反応の後、ダイデオキシ法により行った。499アミノ酸からなるペプチドをコード可能な1497bpのオープンリーディングフレームが観察された。図3~5(配列表:配列番号1)にその塩基配列とそこから推定したアミノ酸配列を示した。γ-カロチンデサチュラーゼ遺伝子の塩基配列やアミノ酸配列はこの報告が最初である。さらに、Genbank、EMBLのデータベースを

用いて、zds遺伝子産物(Zds)のホモロジー検索を行ったところ、ホモロジーが認められたものは、すべて、カロチノイドデサチュラーゼであった。このカロチノイドデサチュラーゼは、*Rhodobacter capsulatus*のcrtD以外は、すべて、フィトエンデサチュラーゼであった。その中で特に高いホモロジーが認められたのは、*Erwinia*と*R. capsulatus*のCrtIであった。図6~7に、Zdsと*Er. uredovora*のCrtI、および、*R. capsulatus*のCrtIのアミノ酸配列の比較を行った結果を示した。ギャップを考慮したホモロジー分析の結果、Zdsは、*Er. uredovora*のCrtI、および、*R. capsulatus*のCrtIと、それぞれ、36%、34%のアイデンティティーを示した。一方、植物やシアノバクテリアのフィトエンデサチュラーゼとは、一部のN-末領域を除いて、ほとんどホモロジーは認められなかった。この領域は、NADやFAD等の補酵素の結合領域であると推定されている。この領域のみ、シアノバクテリア*Synechococcus* PCC7942のフィトエンデサチュラーゼ遺伝子pds (Chamovitz, D; Pecker, I.; Hirschberg, J. The molecular basis of resistance to the herbicide norflurazon. J. Plant Mol. Biol., Vol. 16, p.967-974 (1991)参照)、および、ダイズのフィトエンデサチュラーゼpds1 (Bartley, G.E.; Vitonen, P.V.; Pecker, I.; Chamovitz, D.; Hirschberg, J.; Scolnik, P.A. Molecular cloning and expression in photosynthetic bacteria of a soybean cDNA coding for phytoene desaturase, an enzyme of the carotenoid biosynthesis pathway. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 88, p.6532-6536 (1991)参照)を合わせて図6~7に示した。

【0018】

【発明の効果】

背景

前述したように、フィトエンデサチュラーゼは、遺伝子レベルで今までに明かにされたカロチノイド合成酵素の中で、唯一、生物間で多様性を有している酵素である。また、前述したように、植物において、フェトエンからγ-カロチンを経てリコピンに至るデサチュレーション反応は、ブリーチング除草剤と呼ばれる多くの除草剤の作用部位である。*Erwinia*のフィトエンデサチュラーゼは、フィトエンからγ-カロチンを経てリコピンに至るデサチュレーション反応を一つの酵素で触媒できる酵素であり(前記Journal of Bacteriology, Vol. 172, No. 12, p.6704-6712 (1992)、および本発明者らによる前記特許出願明細書)、*Erwinia*のフィトエンデサチュラーゼのような強力な脱水素機能を示す酵素は、現在までにその機能が明かにされているいくつかの生物のフィトエンデサチュラーゼの中では唯一のもので

19

ある。また、前述したように、*Erwinia*のフィトエンデサチュラーゼと植物のフィトエンデサチュラーゼは、アミノ酸配列レベルで、ホモロジーは一部のN-末領域を除いて見出されないことから、*Erwinia*のフィトエンデサチュラーゼ遺伝子を、葉緑体への移行に必要なトランジットペプチド配列を付加して植物に導入することにより、植物のフィトエンデサチュラーゼを阻害する除草剤に抵抗性を与えることが可能であることが予想される。一方、植物の $\gamma$ -カロチンデサチュラーゼを阻害する除草剤に対する抵抗性に関しては、最近、ようやく、シアノバクテリア*Anabaena* PCC 7120からこの酵素をコードする遺伝子がクローニングされたばかりであり（前記FEMS Microbiol. Lett., Vol. 106, p.99-103 (1993)参照）、そのアミノ酸配列がまだ明かにされていないことや、この抵抗性に関する研究例が現在までに全く無いことから、*Erwinia*のフィトエンデサチュラーゼ遺伝子を利用して、 $\gamma$ -カロチンデサチュラーゼ阻害剤に対する抵抗性を植物に与えられるかどうかは全くわからないのが現状であった。さらに、本発明者らは、最近シアノバクテリアからクロー

10

20

30

20

のフィトエンデサチュラーゼ遺伝子は、植物の $\gamma$ -カロチンデサチュラーゼを阻害する除草剤に対する抵抗性を与えることはできないと予測するであろう。一方、植物の形質転換実験は、植物病原菌*Agrobacterium tumefaciens*のTiプラスミドの系を用いて、現在では普通に行われているが、外来遺伝子が植物に導入されたことを示すマーカー遺伝子は、抗生物質耐性遺伝子であるカナマイシンやハイグロマイシン耐性遺伝子位しか実際に使えるものは無く、このことが、これらの薬剤に抵抗性を示す種々の植物種の形質転換や、一つの植物体への複数の遺伝子の導入実験等を困難なものにしていた。

#### 本発明の効果

本発明により、フィトエンをリコピンに変換する酵素活性を有するフィトエンデサチュラーゼ遺伝子を利用して、ノルフルラゾンやフルリドンのような植物のフィトエンデサチュラーゼを阻害する除草剤だけでなく、SAN380HやJ852等の植物の $\gamma$ -カロチンデサチュラーゼを阻害する除草剤に対する耐性を植物に与えることが可能になったとともに、これらの除草剤を形質転換時のマーカーとして使用することが可能になった。

【0019】

#### 【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：2076

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

起源

生物名：シアノバクテリア *Anabaena*

株名：PCC7120

#### 配列

GATCGCTCTA CAATTTAGTC TTTTGCGAAT TAAAAGAGCA AAATTTTCT TGGTAAAAAT	60
CAACCGAAAA ATGAAAGAT GAGAAATTTAT GACGCAAAATT TATCACCCAA ACTAAACAAA	120
TTTCCTTGAT TGCTTCAGC AAGTGTTTAA AAAATATAGG CTGCCTAAGT AAACGAGGAG	180
TTCATCT ATG TCT AAA AAA GTT GCG ATT GTC GGC GCA GGC CCT GGA GGT	229
Met Ser Lys Lys Val Ala Ile Val Gly Ala Gly Pro Gly Gly	
1 5 10	
TTA GCT ACA GCT ATC CGT CTT GCT GGA CTT GGG TAT CAA GTA GAA ATC	277
Leu Ala Thr Ala Ile Arg Leu Ala Gly Leu Gly Tyr Gln Val Glu Ile	
15 20 25 30	
TTT GAG GCG GCT GAA CGT GTT GGT GGA AGA ATG CGC GGT TTT GAA GTT	325
Phe Glu Ala Ala Glu Arg Val Gly Gly Arg Met Arg Gly Phe Glu Val	
35 40 45	
GAT TCC TAC GCC TTT GAT ACT GGC CCC ACT ATT CTC CAA CTA CCA CAC	373
Asp Ser Tyr Ala Phe Asp Thr Gly Pro Thr Ile Leu Gln Leu Pro His	
50 55 60	
TTA TAT AAA GAG CTT TTT GAG GAG GCT GGT TTA AAT TTT GCC GAC TAT	421

21	22
Leu Tyr Lys Glu Leu Phe Glu Glu Ala Gly Leu Asn Phe Ala Asp Tyr	
65 70 75	
GTT CAA CTC AAA CGT TTA GAA CCA TAT ACA CGT TTG AAA TTT TGG GAT	469
Val Gln Leu Lys Arg Leu Glu Pro Tyr Thr Arg Leu Lys Phe Trp Asp	
80 85 90	
GGT ACT CAA CTG GAT ATC ACT TCG GAT CTA CAG TCA TTT AAA ACC CAA	517
Gly Thr Gln Leu Asp Ile Thr Ser Asp Leu Gln Ser Phe Lys Thr Gln	
95 100 105 110	
CTG GCA ACC TTA CGC TCC GAT TTA CCA TTA GCA TTT GAT CGC TGG TAT	565
Leu Ala Thr Leu Arg Ser Asp Leu Pro Leu Ala Phe Asp Arg Trp Tyr	
115 120 125	
AGT GAG CAT ATC CGT AAA TAT GAG TTA GGT TAC AAA CCC TAT TTA GCC	613
Ser Glu His Ile Arg Lys Tyr Glu Leu Gly Tyr Lys Pro Tyr Leu Ala	
130 135 140	
GGC CCT GCA CGC TCT ATT TTT GGT TAC TTG CGC CCA GAT GAC CTG ATG	661
Gly Pro Ala Arg Ser Ile Phe Gly Tyr Leu Arg Pro Asp Asp Leu Met	
145 150 155	
AAG TTT TTG TCT TTT CGT CCT TGG GAA AAT TTA TAT CAA CAC TTT TGG	709
Lys Phe Leu Ser Phe Arg Pro Trp Glu Asn Leu Tyr Gln His Phe Trp	
160 165 170	
CGA TTT TTT CAA GAT GAG CGT TTA GTC TAT GAT CTG AGA TAT CCG TCA	757
Arg Phe Phe Gln Asp Glu Arg Leu Val Tyr Asp Leu Arg Tyr Pro Ser	
175 180 185 190	
AAA TAT TTG GGA ATG CAC CCA ACT GTG GCA TCA AGT GTC TTT AGC CTG	805
Lys Tyr Leu Gly Met His Pro Thr Val Ala Ser Ser Val Phe Ser Leu	
195 200 205	
ATT CCA TTC TTA GAA TTT TCC CAA GGA GTA TGG CAT CCA GTC GGT GGA	853
Ile Pro Phe Leu Glu Phe Ser Gln Gly Val Trp His Pro Val Gly Gly	
210 215 220	
TTT CGT GCA TTA GCT CAG GGC TTG GCT AAT GCC GCT CAA GAC TTA GGA	901
Phe Arg Ala Leu Ala Gln Gly Leu Ala Asn Ala Ala Gln Asp Leu Gly	
225 230 235	
GTG AAA ATT CAT CTG CAT TCG CCT GTT CAC CAA ATC TGG ATT GAC CAA	949
Val Lys Ile His Leu His Ser Pro Val His Gln Ile Trp Ile Asp Gln	
240 245 250	
GGG CAA GTT CGT GGT TTG GAA CTG GCT GAT GCT TCT CGC CAT CAG TTT	997
Gly Gln Val Arg Gly Leu Glu Leu Ala Asp Ala Ser Arg His Gln Phe	
255 260 265 270	
GAT ACA GTA GTG ATT AAT GCT GAC TTT GCC TAT GCT GTT CGT CAT CTG	1045
Asp Thr Val Val Ile Asn Ala Asp Phe Ala Tyr Ala Val Arg His Leu	
275 280 285	
TTA CCA ACT TCA GCA CGC GGT CGT TAC ACT GAT AAC AAG CTT GGG CAA	1093
Leu Pro Thr Ser Ala Arg Gly Arg Tyr Thr Asp Asn Lys Leu Gly Gln	
290 295 300	
ATG CAA TTC TCA TGC TCT ACC TTC ATG ATC TAT TTA TCA GAC AAT CTT	1141
Met Gln Phe Ser Cys Ser Thr Phe Met Leu Tyr Leu Gly Ile Asn Arg	
305 310 315	
TAT TTG GGT ATC AAT CGC CGC TAC GAA GAT TTA CCT CAT CAT CAA ATT	1189
Arg Tyr Glu Asp Leu Pro His His Gln Ile Tyr Leu Ser Asp Asn Ile	
320 325 330	

23  
CGC CGA CTT GAA CGT CCT TGG GTT GAT GAT TCA GCA CTA GAT GAA ACT 1237  
Arg Arg Leu Glu Arg Pro Trp Val Asp Asp Ser Ala Leu Asp Glu Thr  
335 340 345 350  
GAT CCA CCA TTT TAT GTC TGT AAT CCT ACA ATT ATC GAC CCC AGT AAT 1285  
Asp Pro Pro Phe Tyr Val Cys Asn Pro Thr Ile Ile Asp Pro Ser Asn  
355 360 365  
GCA CCT GCC GGC CAC AGC ACT TTA TTT GTT TTA GTA CCA ATT CCC AAC 1333  
Ala Pro Ala Gly His Ser Thr Leu Phe Val Leu Val Pro Ile Pro Asn  
370 375 380  
ACT TCT TAT GCT GTT GAC TGG GAT ATT AAA CAA AAA AGC TAT ACA GAT 1381  
Thr Ser Tyr Ala Val Asp Trp Asp Ile Lys Gln Lys Ser Tyr Thr Asp  
385 390 395  
TTT ATT CTT AAA CGT TTA CAT TTG CTG GGA TAT CAC AAT ATT GAA CAG 1429  
Phe Ile Leu Lys Arg Leu His Leu Leu Gly Tyr His Asn Ile Glu Gln  
400 405 410  
CAC ATT GTT ACC CAA AGT TGT TAC ACA GCA CAA TCT TGG CTT GAT GAT 1477  
His Ile Val Thr Gln Ser Cys Tyr Thr Ala Gln Ser Trp Leu Asp Asp  
415 420 425 430  
TAT CGC GTT CAT TTG GGT GCT GTG TTT AAT CTC AGC CAC AAT TTG ACT 1525  
Tyr Arg Val His Leu Gly Ala Val Phe Asn Leu Ser His Asn Leu Thr  
335 340 445  
CAG CTT GGG CCC TTT CGT CCA CCC ATC CGT TCG GAA AAT ATT GCC GGA 1573  
Gln Leu Gly Pro Phe Arg Pro Pro Ile Arg Ser Glu Asn Ile Ala Gly  
450 455 460  
CTG TAC TGG ATT GGT GGC GCT GTT CAT CCC GGC AGT GGT TTA CTC ACT 1621  
Leu Tyr Trp Ile Gly Gly Ala Val His Pro Gly Ser Gly Leu Leu Thr  
465 470 475  
ATT TTG GAA GCA TCT CGT AGT GCT GCT GGA TTT ATT CAT CAA GAT TTT 1669  
Ile Leu Glu Ala Ser Arg Ser Ala Ala Gly Phe Ile His Gln Asp Phe  
480 485 490  
GCT TCA ACT GGG TCT TAGCAATCCT GTTCTTACC TAGCTATTTT TTTTACCCAG 1724  
Ala Ser Thr Gly Ser\*\*\*  
495  
AGTCATGTTT AGCTGTCGCA TTCGGATTTT TTAAATTA AAATACGAGC TAGTTTAGCA 1784  
TTAACAATCA AAAGCTGTC TGGATTTT TAAGGGCAGC TTTGCTCTG TGAATTAAG 1844  
ATAAACCAGA AACCAATCAC ATACACCCGC TCTGGACACT TGCCACATAT TCAAACAATG 1904  
GCAATIGAAT CACTTGACCT TGTITTCGGT AACGCAAGA TATGCCTCAT CCAAGGCTAC 1964  
CCCTTCTACT ACGTCAGTGT AGCGITTGAA TATTTCTGTTG ATTTGGGCAG ACACTTCTCG 2024  
GTAGACATCA AATCTCGGTC TGACAAATAT TAATCGGGG CAAAGAGCGA TC 2076

## 【図面の簡単な説明】

【図1】 *Erwinia* と植物およびシアノバクテリアにおける、ファルネシルピロリン酸からβ-カロチンまでの生合成経路を示す説明図。

【図2】 作製した、*Erwinia uredovora* のフィトエンデサチュラーゼ遺伝子 *crtI* の植物への導入用プラスミドの *crtI* 部分を示す説明図。この *crtI* には、葉緑体へのターゲティングに必要なエンドウの *Rubisco* 小サブユニットのトランジットベプチド配列が付加されている。

【図3】 シアノバクテリア *Anabaena* PCC 7 50

40 120 のβ-カロチンデサチュラーゼ遺伝子 *zds* の塩基配列およびそこから推定したアミノ酸配列を示す説明図。下線は、リボソーム結合部位と推定される配列である。

【図4】 図3に続く塩基配列およびアミノ酸配列を示す説明図。

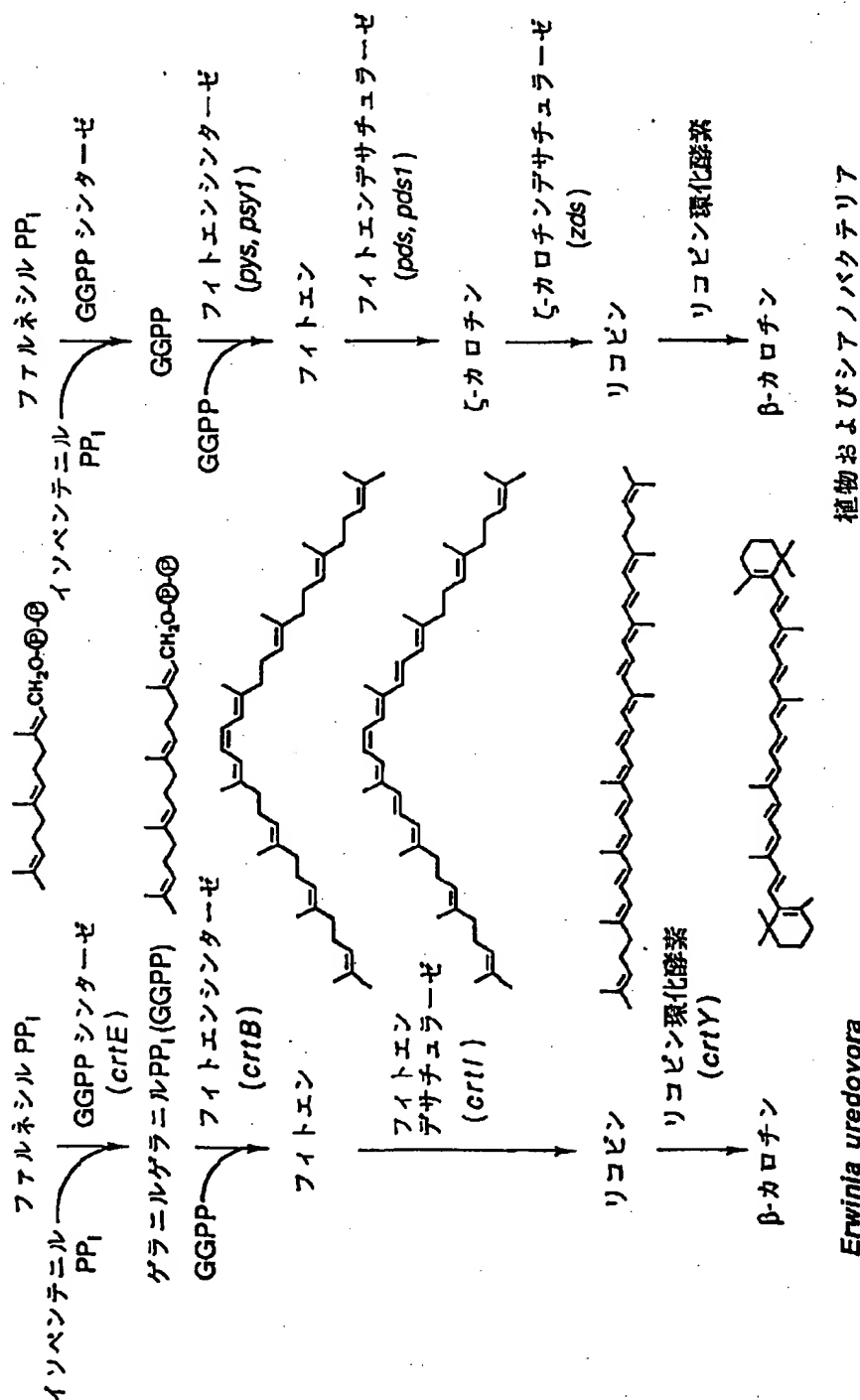
【図5】 図4に続く塩基配列およびアミノ酸配列を示す説明図。

【図6】 *Anabaena* PCC 7 120 のβ-カロチンデサチュラーゼ遺伝子産物 *Zds* と種々の生物から取得されたフィトエンデサチュラーゼのアミノ酸配列の

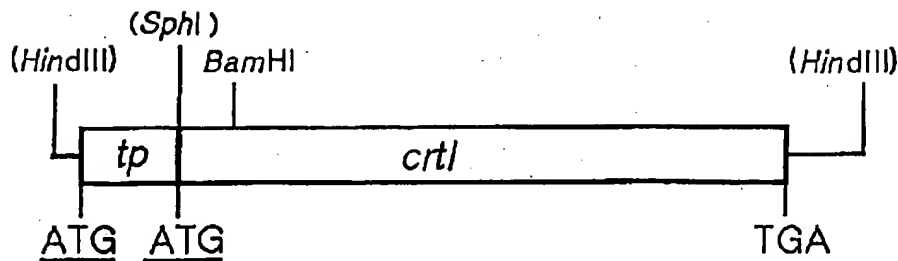
を示している。下線は、このすべてに共通なアミノ酸を示し、\*は Er. uredovora の Cr t I および R. capsulatus の Cr t I と共通なアミノ酸を示している。

【図7】 図6に続くアミノ酸配列の比較を示す説明図。

【图 1】



【図2】



ATG GCT TCT ATG ATA TCC TCT TOC GCT GTG ACA ACA GTC AGC CGT GGC TCT AGG  
Met Ala Ser Met Ile Ser Ser Ser Ala Val Thr Thr Val Ser Arg Ala Ser Arg

トランジットペプチドの始まり

GGG CAATCC GCC GCA GTG GCT CCA TTC GGC GGC CTC AAA TCC ATG ACT GGA TTC  
Gly Gln Ser Ala Ala Val Ala Pro Phe Gly Gly Leu Lys Ser Met Thr Gly Phe

CCA GTG AAG AAG GTC AAC ACT GAC ATT ACT TOC ATT ACA AGC AAT GGT GGA AGA  
Pro Val Lys Lys Val Asn Thr Asp Ile Thr Ser Ile Thr Ser Asn Gly Gly Arg

GTA AAG TGC ATG AAA CCA ACT ACG GTA ATT GGT GCA GGC TTC -----  
Val Lys Cys Met Lys Pro Thr Thr Val Ile Gly Ala Gly Phe -----

crtI の始まり

plasmid pYPIET4



【図3】

1 GATCGCTCTACAATTAGTCTTTTGGCAATTAAAGAGCAAAATTTTCTTGGTGAATAATCAACCGAATAATGAAAAGAT  
 81 GAGAAATTTAIGACGCAAAATTTATCACCCAACTAAACAATTTTCCTTGATTGTCTTCAGCAAGTGTTTAAAAAATATAGG  
 161 CTGCCCTAAGTAAACGAGGAGUICATCTATGTCTAANAAGTTGCGATTGTCCGGCGAGGCCCTGGAGGTTTACGTACAGC  
     MetSerLysLysValAlaIleValGlyAlaGlyProGlyGlyLeuAlaThrAla  
 241 TATCCGCTCTGCTGGACTTGGGTATCAAGTAGAATCTTTGAGGCGCTGAACCTGTGTGGTGAAGAATGCCGCGTTTIG  
     IleArgLeuAlaGlyLeuGlyTyrGlnValGluIlePheGluAlaAlaGluArgValGlyGlyArgMetArgGlyPhe  
 321 AAGTTGATTCCCTACGCCCTTTGATACCTGCCCCACTATTCTCCAACTACCACACTTATATAAAGAGCTTTTIGAGGAGGCT  
     GluValAspSerTyrAlaPheAspThrGlyProThrIleLeuGlnLeuProHisLeuTyrLysGluLeuPheGluGluAla  
 401 GGTTTAAATTTTCCGACTATGTTCAACTCAACCGTTTACAACCATATACACGTTTGAATTTTGGGATGGTACTCAACT  
     GlyLeuAsnPheAlaAspTyrValGlnLeuLysArgLeuGluProTyrThrArgLeuLysPheTyrAspGlyThrGlnLeu  
 481 GGATATCATTCCGGATCTACAGTCATTAAACCCCACTGGCAACCTTACGCTCCGATTACCATTAGCATTGATCGCT  
     AspIleThrSerAspLeuGlnSerPheLysThrGlnLeuAlaThrLeuArgSerAspLeuProLeuAlaPheAspArg  
 561 GGATAGTGAGCATATCCGTAATAATAGATTAGTTAGTTACAACCCCTATTAGCCGGCCCTGCACGCTCTATTTTGGTTAC  
     TrpTyrSerGluHisIleArgLysTyrGluLeuGlyTyrLysProTyrLeuAlaGlyProAlaArgSerIlePheGlyTyr  
 641 TTGCGCCCGAGATGACCTGATGAAGTTTGTCTTTTTCGTCCTTGGGAAAATTTATATCAACACTTTTGGCGATTTTTC  
     LeuArgProAspAspLeuMetLysPheLeuSerPheArgProTyrGluAsnLeuTyrGlnHisPheTyrArgPhePheGln  
 721 AGATGAGCGTTTATGCTATGATCTGAGATATCCGTCAAAATATTGCGAATGCACCCCACTGTGGCATCAAGTGTCTTTA  
     AspGluArgLeuValTyrAspLeuArgTyrProSerLysTyrLeuGlyMetHisProThrValAlaSerSerValPhe

[図4]

801 GCCTGATTCATTCTTAGAATTTTCCCAAGGAGTATGGCATCCAGTCGGTGGATTTCGTGCATTAGCTCAGGGCTTGGCT  
 SerLeuIleProPheLeuGluPheSerGlnGlyValTrpHisProValGlyGlyPheArgAlaLeuAlaGlnGlyLeuAla  
 881 AATGCCGCTCAAGACTTAGGAGTGAAATTCATCTGCATTGCGCTGTTCCACCAATCTGGATTGACCAAGGGCAAGTTCCG  
 AsnAlaAlaGlnAspLeuGlyValLysIleHisLeuHisSerProValHisGlnIleTrpIleAspGlnGlyGlnValArg  
 961 TGGTTTGGAACTGGCTGATGCTTCTCGCCNATCAGTTTGATACAGTAGTGATTAAATGCTGACTTTGCTATGCTGTTTCGTC  
 GlyLeuGluLeuAlaAspAlaSerArgHisGlnPheAspThrValValIleAsnAlaAspPheAlaTyrAlaValArg  
 1041 ATCTGTTACCAACTTCAGCACGCGGCTGTTACACTGATAACAAGCTTGGGCAATGCAATTTCTCATGCTCTACCTTCATG  
 HisLeuLeuProThrSerAlaArgGlyArgTyrThrAspAsnLysLeuGlyGlnMetGlnPheSerCysSerThrPheMet  
 1121 CTTTATTGGGTATCAATCGCCGCTACGAAGATTACCTCATCAATCTATTTATCAGACAAATATTCGCCGACTTGA  
 LeuTyrLeuGlyIleAsnArgArgTyrGluAspLeuProHisHisGlnIleTyrLeuSerAspAsnIleArgArgLeuGlu  
 1201 ACGTCCTGGGTTGATTCAGCACTAGATGAACCTGATCCACCATTTTATGCTGTGTAATCCTACAATATTCGACCCCA  
 ArgProTrpValAspAspSerAlaLeuAspGluThrAspProProPheTyrValCysAsnProThrIleIleAspPro  
 1281 GTATGCACCTGCCGCCACAGCACTTTATTGTTTATTAGTACCAATTCACCACTTCTTATGCTGTTGACTGGGATATT  
 SerAsnAlaProAlaGlyHisSerThrLeuPheValLeuValProIleProAsnThrSerTyrAlaValAspTrpAspIle  
 1361 AAACAAAAMAGCTATACAGATTTTATTCTTAAACGTTTACATTTGCTGGGATATCACAATATTGAAACAGCACATTTGTTAC  
 LysGlnLysSerTyrThrAspPheIleLeuLysArgLeuHisLeuLeuGlyTyrHisAsnIleGluGlnHisIleValThr  
 1441 CCAMGTTGTTACACAGCACAACTTGGCTTGATGATTATCGGGTTCATTTGGGTCGTGTTTAAATCTCAGCCACAATT  
 GlnSerCysTyrThrAlaGlnSerTrpLeuAspAspTyrArgValHisLeuGlyAlaValPheAsnLeuSerHisAsn

[図5]

1521 TGACTCAGCTTGGGCCCTTTTCGTCCACCCATCCGTTCCGGAATAATATGCCGGACTGTACTGGATTGGTGGCGCTGTTTCAT  
     LeuThrGlnLeuGlyProPheArgProProlleArgSerGluAsnIleAlaGlyLeuTyrTrpIleGlyGlyAlaValHis  
 1601 CCCGGCAGTGGTTTACTCACTATTTTGGAMGCATCTCGTAGTCCTGCTGGATTTTATTCATCAAGATTTTTCCTTCAACTGG  
     ProGlySerGlyLeuLeuThrIleLeuGluAlaSerArgSerAlaAlaGlyPheIleHisGlnAspPheAlaSerThrGly  
 1681 GTCTTAGCAATCCTGTCTTTTACCTAGCTATTTTTTTTACCAGAGTCATGTTTAGCTGTCCGCAATTCGGATTTTTTTAAAN  
     Ser\*\*\*  
 1761 TTAAAAATACGAGCTAGTTTAGCATTAACAATCAAAAGCTGTTCTGGATTTTACTAGGGCAGCTTTTGCTCCTGTGGAAT  
 1841 TAAGATAAACCGAAACCAATCACATACACCGCTCTGGACACTTGCCACATATTCAAAACAATGGCAATTGAATCACTTG  
 1921 ACCTTGTTTTCGGTAACGTCAAGATATGCCCTCATCCAGGCTACCCCTTCTACTACGTCAGTGTAGCGTTTGAATATTTTC  
 2001 GTGGATTTGGGCAGACACTTCTCGGTAGACATCAAAATCTCGGTCTGACAAATATTAATCGGGGGGCAAGAGCGGATC

[図6]

Zds	.....MSKK	VAIVGAGPGG	LATAIRLAGL	GYQEIFEAA	ERVGGRMRGF	44
Eu-CrtI	.....MKP	TTVIGAGEGG	LALAIRLQAA	GIPVLLLEQR	DKPGGRAYVY	43
Rc-CrtI	MSKNTEGMGR	AVVIGAGLGG	LAAAMRLGAK	GKVTVVVDRL	DRPGGRGSSI	50
Pds	.....MR	VAIAGAGLAG	LSCAKYLADA	GHTPIVYERR	DVLGGKVAAW	42
Pds1	ASPRPLKPLN	IVIAGAGLAG	LSTAKYLADA	GHKPILLEAR	DVLGGKVAAW	140
Zds	** *	** *	** *	** *	*	
Eu-CrtI	EVDSYAFDTG	PTILQLPHLY	KELFEEAGLN	FADYVQLKRL	EPYTRLKEWD	94
Rc-CrtI	EDQGFTFDAG	PTVITDPSAI	EELFALAGKQ	LKEYVELLPV	TPFYRLCWES	93
	TKGGRHFDLG	PTIVTVPDRL	RELWADCGRD	FDKDVSLVPM	EPFYTIDFPD	100
Zds	*	*		**	*	
Eu-CrtI	GTOLDITSDL	QSFKTQLATL	RSDLPLAFDR	WYSEHIRKYE	LGYKPYLAGP	144
Rc-CrtI	GKVENYDNDQ	TRLEAQIQOF	NPRDVEGYRQ	FLDYSRAVEK	EGYLLKLTVP	143
	GEKYTAYGDD	AKVKAEVARI	SPGDVEGFRH	FMWDAAKAYE	FGYENLGRKP	150
Zds		*	*	*	*	
Eu-CrtI	ARSIFGYLRP	DDLKMKELSER	PWENLYQHFW	REFQDERLVY	DLRYPISKYLG	194
Rc-CrtI	FLSFRDMLRA	APQLAKL--Q	AWRSVYSKVA	SYIEDEHLRQ	AFSEHSLLVG	191
	MSKLWDLIKV	LPTEGWL--R	ADRSVYGHAK	KMVKDDHLRF	ALSEHPLFIG	198
Zds	*	*	**	**	*	
Eu-CrtI	MHPTVASSVF	SLIPFLEFSQ	GVWHPVGGFR	ALAAQLANAA	QDLGVKIHLLH	244
Rc-CrtI	GNPFATSSIY	TLIHALEREW	GVWFPRGGTG	ALVQGMIKLF	QDLGGEVVLN	241
	GDPEFHVTSY	ILVSQLEKKE	GVHYAIGGVQ	AIADAMAKVI	TDQGGEMRLN	248

## 【図7】

	*		*	*	*	***		**	
Zds	SPVHQ-IWID	QGQVRGLELA	DASRHQFDTV	VINADFAYAV	RHLLPTSARG				293
Eu-CrtI	ARVSH-METT	GNKIEAVHLE	DGRRFLTQAV	ASNADVHTY	RDLLSQHPAA				290
Rc-CrtI	TEVDEILVSR	DGKATGIRLM	DGTELPQV	VSNADAGHTY	KRLLRNRDRW				298
	**	*	*	*	*		**		
Zds	RYTDNKLQOM	QFSCSTFMLY	LGINRRYE--	-DLPHHQIYL	SDNIRRLERP				340
Eu-CrtI	VKQSNKLQTK	RMSNSLFVLY	FGLNHHHD--	-QLAHHTVCF	GPRYRELIDE				337
Rc-CrtI	RWTDEKLDKK	RWSMGLFVWY	FGTKGTAKMW	KDVGHHTVV	GPRYKEHVQD				348
	*	*	*	*	*	***	*	*	*
Zds	WVDDSADET	DPFFYVCNPT	IIDPSNAPAG	HSTLFVLVPI	PNTS--YAVD				388
Eu-CrtI	IFNHDGLAE-	DFSLYLHAPC	VTDSLLAPEG	CGSYVVLAPV	PHLG-TANLD				385
Rc-CrtI	IFIKGELAE-	DMSLYVHRPS	VTDPATAAPKG	DDTFYVLSPV	PNLGFDNQVD				397
	*			*	*		*		
Zds	WDIKQKSYTD	FILKRLHLLG	YHNIEQHIVT	QSCYTAQSWL	DDYRVHLGAV				438
Eu-CrtI	WVEGPKLRD	RIFAYLEQHY	MPGLRSQLV	HRMFTPFDFR	DQLNAYHGSA				435
Rc-CrtI	WSVEAEKYKA	KVLKVIEERL	LPGVAEKITE	EVVETPETFR	DRYLSPLGAG				447
	*	*	***	**	*	***	*		
Zds	FNLSHNLQOL	GPFRPPIRSE	NIAGLYWIGG	AVHPGSGLLT	ILEASRSAAG				488
Eu-CrtI	FSVEPVLTQS	AWFRPHNRDK	TITNLYLVGA	GTHPGAGIPG	VIGSAKATAG				485
Rc-CrtI	FSLEPRILQS	AWFRPHNASE	EVDGLYLVGA	GTHPGAGVPS	VIGSGELVAQ				497
Zds	FIHQDFASTG	S.....	.....	.....	.....				499
Eu-CrtI	LMLEDLI...	.....	.....	.....	.....				492
Rc-CrtI	MIPDAPKPET	PAAAAPKART	PRAKAAQ...	.....	.....				524

フロントページの続き

(51) Int. Cl. 5

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

C 1 2 R 1:18)